

明 細 書

肝炎ウイルスの増殖方法及び装置

技術分野

本発明は、C型肝炎ウイルス（HCV）等の肝炎ウイルスの増殖方法及びその装置に関する。

背景技術

HCVは1989年にcDNAがクローニングされ、その後各種発現系を駆使してその構造及びプロセッシング機構が明らかにされてきた。その結果、非常に有効な診断系が開発され、我が国におけるHCVによる輸血後肝炎は現時点ではほぼ制圧された。

以上のように、HCVの全容は明らかになりつつあるが、遺伝子レベルの研究が先行し、未だにウイルスの複製、粒子形成、変異等の生物学及び発癌機構の解明などの基礎的な研究は進んでおらず、HCVのワクチン、プロテアーゼ阻害剤、アンチセンス等の薬剤による治療法の開発も進展していない。これは、生体外におけるHCVの増殖系が未だに存在しないことに起因する。HCVを培養肝細胞中で増殖させることは非常に困難なことであり、未だかつてこれに成功したという報告はない。従って、現在、上記の研究にはチンパンジーを用いるしか方法がない。しかし、これは非常に高価であり、個体差や再現性にも問題がある。また、動物愛護の点からもその利用には限界がある。このような背景から、臨床治験や動物実験に依存しない培養細胞を用いたHCV等の肝炎ウイルスの増殖系の確立が望まれている。

発明の開示

従って、本発明の目的は、培養肝細胞を用いた、HCV等の肝炎ウイルスの増殖方法を提供することである。また、本発明は、肝細胞などの接着性に低い細胞を生体外で3次元的に長期にかつ大量に培養する方法を提供するものである。さ

らに、本発明は、H C Vなどの肝炎ウイルスの増殖方法を提供するものである。

本発明者は、鋭意研究の結果、肝細胞を担持させた担体を収容した培養器に培養液を流通させる培養装置、例えばラジアルフロー型バイオリアクター内で肝細胞を培養し、これにH C Vを感染させ、肝細胞の培養を継続することによりH C V等の肝炎ウイルスを増殖させることが可能であることを見出し本発明を完成した。

すなわち、本発明は、肝細胞などの接着性の低い細胞を担持させ得る担体を収容した培養器の担体周縁に培養液の流れを作り、接着性の低い細胞を当該担体に担持させて増殖させることからなる、接着性の低い細胞を長期にかつ大量に、さらに効率的に増殖する方法に関する。また、本発明は、肝細胞などの接着性の低い細胞を担持させ得る担体を収容した培養器の担体周縁に培養液の流れを作り、接着性の低い細胞を当該担体に担持させて増殖させ、培養されている細胞に肝炎ウイルスを感染させることからなる肝炎ウイルスの増殖方法に関する。

より詳細には、本発明は、肝細胞を担持させた担体を収容した培養器の周縁部から中心部に向けて培養液を流通させる培養装置で培養されている肝細胞に肝炎ウイルスを感染させることからなる肝炎ウイルスの増殖方法に関する。また、本発明は、肝炎ウイルスを増殖させるために装置、本発明の方法により増殖させた肝炎ウイルスに関する。

さらに詳細には、本発明は、粒子状の多孔性担体上に肝細胞を担持させたものを収容するバイオリアクター本体の周縁部から中心部に向けて培養液を流通させるラジアルフロー型肝細胞バイオリアクター中に維持された前記肝細胞に肝炎ウイルスを感染させ、引き続きバイオリアクター本体の周縁部から中心部に向けて培養液を流通させて前記肝細胞を培養し、それによって前記感染された肝炎ウイルスを前記肝細胞中で増殖させることを含む、肝炎ウイルスの増殖方法を提供する。また、本発明は、周縁部から中心部に向けて培養液を流通させることができるバイオリアクター本体と、該バイオリアクター本体の周縁部に培養液を供給する培養液供給路と、該バイオリアクター本体の内部に収容され、その上に肝細胞が担持される粒子状の多孔性担体と、該バイオリアクター本体の内部に位置し、培養液をバイオリアクター本体から排出する培養液排出路とを具備したラジアル

フロー型肝細胞バイオリアクターから成る肝炎ウイルスの増殖装置を提供する。

本発明の肝炎ウイルスとしては、肝臓の細胞に感染して増殖可能なウイルスであればよく、HCV、HBV、HEVなどのいわゆる肝炎ウイルスや、肝細胞に感染するデング熱ウイルスなどが好ましい。また、本発明の接着性の低い細胞としては、培養器の担体に接着性が低く、従来技術では担体上で3次元的な培養が困難であるとされていた細胞であり、例えば肝細胞などが好ましい。

本発明の方法によれば、排出される培養液中に増殖されたHCVなどの肝炎ウイルスを得ることができる。このように、本発明は、培養細胞を用いて、生体外でHCVなどの肝炎ウイルスを効率良く増殖させる方法を初めて提供するものである。

従って、本発明は、従来治療に用いられてきたインターフェロンの効果予測はもちろん、HCVなどの肝炎ウイルスワクチンの開発、抗HCV抗体の調製、プロテアーゼ阻害剤、ポリメラーゼ阻害剤やアンチセンス薬剤等のHCVなどの肝炎ウイルスの治療薬の開発等に大いに貢献するものである。

図面の簡単な説明

第1図は、本発明の方法に用いられる培養装置の例としてのラジアルフロー型バイオリアクターの縦断面及び横断面を示す図である。

第2図は、本発明の培養システムの例を模式的に示す図である。

第3図は、血清添加培養液を用いた培養系における、温度(℃)、酸素濃度(ppm)及びアルブミン濃度($\mu\text{g}/\text{ml}$)の推移(第3図(A))、排出培養液中のHCVの検出の結果(第3図(B))、及び培養液中のGPT(IU/l)、GOT(IU/l)、及びLDH(IU/l)の推移(第3図(C))を示したものである。

第3図(A)の白丸印(○)は温度(℃)を示し、黒丸印(●)は酸素濃度(ppm)を示し、白四角印(□)はアルブミン濃度($\mu\text{g}/\text{ml}$)を示す。温度(℃)、及び酸素濃度(ppm)は左側の目盛りで示され、アルブミン濃度($\mu\text{g}/\text{ml}$)は右側の目盛りで示されている。横軸は日数を示している。

第3図(B)の白丸印(○)はRNA力価(\log_{10} コピー数/ml)を示し、白

四角印 (□) は H C V - コア蛋白質が陰性であることを示し、黒四角印 (■) は H C V - コア蛋白質が陽性であることを示し、横軸は培養日数である。

第 3 図 (C) の黒丸印 (●) は G P T (I U / l) を示し、白丸印 (○) は G O T (I U / l) を示し、白四角印 (□) は L D H (I U / l) を示す。G P T (I U / l) 、及び G O T (I U / l) は左側の目盛りで示され、L D H (I U / l) は右側の目盛りで示されている。横軸は日数を示している。

第 4 図は、無血清培養液を用いた培養系における、温度 (℃) 、及び酸素濃度 (p p m) の推移 (第 4 図 (A)) 、排出培養液中の H C V の検出の結果 (第 4 図 (B)) 、及び培養液中の G P T (I U / l) 、G O T (I U / l) 、及び L D H (I U / l) の推移 (第 4 図 (C)) を示したものである。

第 4 図 (A) の白丸印 (○) は温度 (℃) を示し、黒丸印 (●) は酸素濃度 (p p m) を示す。横軸は日数を示している。

第 4 図 (B) の白丸印 (○) は R N A 力価 (log₁₀ コピー数 / m l) を示し、白四角印 (□) は H C V - コア蛋白質が陰性であることを示し、黒四角印 (■) は H C V - コア蛋白質が陽性であることを示し、横軸は培養日数である。

第 4 図 (C) の黒丸印 (●) は G P T (I U / l) を示し、白丸印 (○) は G O T (I U / l) を示し、白四角印 (□) は L D H (I U / l) を示す。G P T (I U / l) 、及び G O T (I U / l) は左側の目盛りで示され、L D H (I U / l) は右側の目盛りで示されている。横軸は日数を示している。

第 5 図は、無血清培養液を用いた培養系で、培養時にタイプ 1 a の感染性クロール RNA をバイオリアクターにトランスフェクションした場合における、温度 (℃) 、酸素濃度 (p p m) 及びアルブミン濃度 (μ g / m l) の推移 (第 5 図 (A)) 、排出培養液中の H C V の検出の結果 (第 5 図 (B)) 、及び培養液中の G P T (I U / l) 、G O T (I U / l) 、及び L D H (I U / l) の推移 (第 5 図 (C)) を示したものである。

第 5 図 (A) の白丸印 (○) は温度 (℃) を示し、黒丸印 (●) は酸素濃度 (p p m) を示し、白四角印 (□) はアルブミン濃度 (μ g / m l) を示す。温度 (℃) 、及び酸素濃度 (p p m) は左側の目盛りで示され、アルブミン濃度 (μ g / m l) は右側の目盛りで示されている。横軸は日数を示している。

第5図(B)の白丸印(○)はRNA力価(\log_{10} コピー数/ml)を示し、白四角印(□)はHCV-コア蛋白質が陰性であることを示し、黒四角印(■)はHCV-コア蛋白質が陽性であることを示し、横軸は培養日数である。

第5図(C)の黒丸印(●)はGPT(IU/l)を示し、白丸印(○)はGOT(IU/l)を示し、白四角印(□)はLDH(IU/l)を示す。GPT(IU/l)、及びGOT(IU/l)は左側の目盛りで示され、LDH(IU/l)は右側の目盛りで示されている。横軸は日数を示している。

第6図は、トランスフェクション後96日目の培養液を蔗糖勾配法にて分画して、それぞれの分画のHCV RNAとHCVのコア蛋白質を測定した結果を示す。第6図の下段のグラフの白丸印(○)はHCV RNAの力価(\log_{10} コピー数/ml)を示し、黒丸印(●)はHCVコア蛋白質の濃度(pg/ml)を示し、第6図の上段のグラフの黒四角印(■)はコア蛋白質の密度(g/ml)を示す。

第7図は、感染性クローンH77をトランスフェクション後8、44日目の培養液を、RNaseでの処理、及びnest-RT PCR法で検出した結果を示す図である。第7図は左側から、培養前日(-1日)の培養液、培養8日目の培養液、培養44日目の培養液、対照としての血清、対照としてのRNAであり、各々、RNase処理無し(RNase-)でnest-RT PCR無し(RT-)、RNase処理無し(RNase-)でnest-RT PCR有り(RT+)、及びRNase処理有り(RNase+)でnest-RT PCR有り(RT+)の3つのレーンで構成されている。第7図の上段の数字は培養日数を示し、+-の表示の上の段はnest-RT PCR処理の有無を有り(+)、無し(-)で示し、下の段はRNase処理の有無を有り(+)、無し(-)で示している。第7図の縦方向の数値は塩基数(mer)を示す。

第8図は、感染性クローンH77をトランスフェクションした後110日目の細胞内にタグを用いたストランド特異的RT-PCR(Strand-specific RT-PCR)法でマイナス鎖RNAを検出した結果を示す図である。第8図のMはマーカーを示し、レーン1のNは細胞(-)で、ネガティブストランドRNA(negative strand RNA)及びポジティブストランドRNA(positive strand RNA)も存在

していないコントロールを示し、レーン 2 の (-) R N A はネガティブストランド R N A (negative strand RNA) を加えた場合を、レーン 3 の (+) R N A はポジティブストランド R N A (positive strand RNA) を加えた場合をそれぞれ示し、レーン 4 の細胞 (C e l l) は R F B で培養した H C V 感染細胞の場合を示す。第 8 図の縦方向の数値は分子量を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明の方法で使用される培養装置としては、肝細胞を担体に担持させ、これを収容した培養器に培養液を流通させ、担持された肝細胞周辺に常に培養液が流通することができる培養装置である。培養液は、培養器のいかなる方向から流通させてもよい。例えば、培養器の周辺部から中心部であってもよいし、下部から上部であってもよく、これらの組み合わせであってもよい。また、肝細胞を担持させる担体としては、培養細胞を担持することができるものであれば特に制限はないが、多孔性の担体が好ましい。担体の材質としてはガラスやプラスチックなどが挙げられる。

本発明の好ましい培養装置として、ラジアルフロー型バイオリアクターが挙げられる。本発明の好ましいラジアルフロー型バイオリアクターの一例を図面に基づいて説明する。

第 1 図には、本発明の好ましいラジアルフロー型バイオリアクターの一例が模式的に示されている。第 1 図の上側の図はラジアルフロー型バイオリアクターの縦断面図であり、下側の図はラジアルフロー型バイオリアクターの横断面図である。ラジアルフロー型バイオリアクター 10 は、円筒状のバイオリアクター本体 (培養器) 12 を含む。バイオリアクター本体 12 の外周壁は多数の貫通孔を有する多孔性材料から成り、これらの貫通孔を通して培養液がバイオリアクター本体の外側から内側に流通できるようになっている。貫通孔の直径は、後述する担体粒子よりも小さく、かつ、バイオリアクター本体 12 内に培養液を十分に供給できる大きさであり、通常 20 ~ 80 μ m 程度が好ましい。断面がバイオリアクター本体 12 と同心円状となるようにバイオリアクター本体 12 のさらに外側を囲包する、円筒状のケーシング 14 が設けられており、バイオリアクター本体 1

2の外周壁と、該ケーシング14との間には、環状の培養液供給路16が形成される。培養液供給路16は、その底部において、培養液供給管18と連通している。バイオリアクター本体12の中心部には、培養液排出管20が設けられている。培養液排出管20の外周壁も、バイオリアクター本体12と同様な大きさの貫通孔を多数有する多孔性材料から成り、培養液は流通できるが、担体は通過できない。

さらに、バイオリアクター本体12の内部には、粒子状の多孔性担体22が多数収容されている。多孔性担体の材料としては、特に限定されないが、好ましい例として球状の多孔性ガラスビーズを挙げることができる。多孔性担体の直径は、特に限定されないが0.1mm～6mm程度が好ましく、特には0.3mm～1.2mm程度が好ましい。また、担体中の孔径は特に限定されないが10～300 μ m程度が好ましく、特には20～120 μ m程度が好ましい。また、担体粒子内の空隙率は、特に限定されないが30～70%程度が好ましく、特には40～60%程度が好ましい。このような多孔質ガラスビーズは、ドイツ国ショットグラスベック社（Schott Glasswerk Co. Ltd.）からシラン（Siran）の商品名で市販されており、この市販品を好ましく用いることができる。また、バイオリアクター本体12内に収容される担体粒子の密度は、特に限定されないが、バイオリアクター本体12内に粒子を重力下でできるだけ多量に注ぎ込むことが好ましい。

上記のラジアルフロー型バイオリアクターのサイズは特に限定されず、バイオリアクター本体12内の容積は、通常、5ml～数十リットル程度であるがこの範囲外でも差し支えない。

次に上記のようなラジアルフロー型バイオリアクターを用いた肝細胞の培養方法について説明する。培養液の流れは第1図において矢印で示されている。すなわち、培養液は培養液供給管18を通じてバイオリアクター本体12の外周部にある培養液供給路16に底部から供給される。培養液は、培養液供給路16を上方に向かって流通するが、バイオリアクター本体12の外壁に設けられている多数の貫通孔からバイオリアクター本体12の内部に進入する。そして、バイオリアクター本体12内を中心に向かって流れ、培養液排出管20に設けられた多数の貫通孔から培養液排出管20内に入り、培養液排出管20内を上方に向かって

移動し、培養液排出管 20 の頂部からバイオリアクター本体 12 の外部に排出される。なお、第 1 図に示されるラジアルフロー型バイオリアクターでは、培養液は底部から供給されるが、バイオリアクター本体 12 の外周部から中心部に向かって培養液が流れればよいので、培養液を培養液供給路 16 の頂部から供給する構成としてもよい。また、排出された培養液の一部は再度循環させて培養液として供給することが好ましい。すなわち、培養液としては、新鮮な培養液と、リサイクルされた培養液の混合物を用いることが好ましい。これらの混合割合は、一日のグルコース消費量 (g/日) / 酸素消費量 (g/日) 比率が 0.5 ~ 1.5、特には 3 ~ 10 程度になるように自動制御することが好ましい。

ここで使用される培養液は、肝細胞を培養し増殖させることができるものであればどのような組成のものでもよく、無機質、糖、アミノ酸、ペプチド、ビタミン類、有機酸、核酸、pH 調整剤、酸素などの細胞の培養に必要な成分を含有するものであればよい。例えば、無機質としては、 NaCl 、 KCl 、 MgCl_2 、 MgSO_4 、 NaH_2PO_4 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ などが挙げられ、アミノ酸、ペプチドとしては、L-アスパラギン塩酸塩、L-アラニン、アラニル-L-グルタミン、L-アスパラギン酸、L-グルタメート、グリシン、グリシル-L-グルタミン、L-イソロイシン、L-リジン、L-フェニルアラニン、L-セリン、L-オルニチン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、インシュリンなどが挙げられ、糖としては、糖や糖アルコール、配糖体などが挙げられ、例えばD-グルコース、D-マンノース、D-ガラクトース、イノシトールなどが挙げられる。有機酸としては、遊離の酸又はエステルなどの有機酸誘導体が挙げられ、例えばコハク酸、コリンニ酒石酸 (choline bitartrate)、葉酸、ピルビン酸ナトリウム、グリセロリン酸などが挙げられる。ビタミン類としては、塩酸ピリドキサール、リボフラビンなどが挙げられる。核酸としては、ウリジンなどが挙げられる。pH 調整剤としては、 NaOH 、炭酸ガス、 NaHCO_3 などが挙げられる。

培養液としては、市販の培養液を用いることもできる。また、これに 1 ~ 3 % 程度の、ウシ胎児血清等の血清を添加したものも好ましく用いることができる。培養液中の酸素濃度及び pH を調整することが好ましい。培養液中の酸素濃度は

排出培養液中の酸素濃度が、1 ppm以上となるように調整することが好ましい。すなわち、バイオリアクター本体（培養器）の容積1 ml当たり、酸素供給量は0.025～0.75 ml/分、特には0.05～0.5 ml/分程度が好ましい。また、新鮮な培養液の供給速度は、特に限定されないが、バイオリアクター本体（培養器）の容積1 ml当たり、通常、0.25～100 ml/日程度、好ましくは0.5～50 ml/日程度である。また、培養液の循環速度は、特に限定されないが、バイオリアクター本体（培養器）の容積1 ml当たり、通常、0.25～2.0 L/日、好ましくは0.5～1.0 L/日程度である。培養液のpHは、水酸化ナトリウム溶液や二酸化炭素等を用いて約7.0に調整することが好ましい。さらに、培養液の温度は、約37℃又はそれ以下に調整することが好ましい。

肝細胞は、上記した多孔性担体の表面及び多孔性担体中の孔の内部表面に付着して増殖する。増殖した肝細胞は、多孔性担体の表面及び孔の内部表面に担持され、さらに多孔性担体間の空隙にも充填される。肝細胞の多孔性担体への付着及び増殖は、培養液中に肝細胞を添加した、肝細胞浮遊液を上記培養液としてラジアルフロー型バイオリアクター内に供給することにより達成することができる。肝細胞浮遊液を培養液として供給すると、培養液が多孔性担体と接触しながら流通していく間に肝細胞が多孔性担体の表面又はその孔の内部表面に付着し、そこで増殖する。

培養開始時に培養液に添加する肝細胞の密度は、特に限定されないが、通常 $10^3 \sim 10^6$ 細胞/ml程度、好ましくは $10^6 \sim 10^7$ 細胞/ml程度であり、また、培養液に添加する肝細胞の総数は、バイオリアクター本体の容積に応じて適宜選択されるが、例えばバイオリアクター本体12内の容積が200 mlの場合には通常 $10^7 \sim 10^{10}$ 個程度、好ましくは $10^8 \sim 10^9$ 個程度が適当である。なお、肝細胞を添加した培養液がバイオリアクター本体内に行き渡った後、3時間～12時間程度は、培養液の流通を止め、肝細胞のバイオリアクター本体からの流出を防いで肝細胞の担体上への付着を促進することが好ましい。

用いる肝細胞は、剖検等によりヒトの肝臓から採取したものを公知の平板培養法等により培養して増殖させたものであってもよいが、長期間にわたって確実に

バイオリアクター内での増殖、維持を達成するために肝細胞の樹立細胞株を用いることが好ましい。肝細胞の樹立細胞株自体は公知であり、いずれの細胞株をも用いることができる。好ましい細胞株の例として、FLC-4（米国特許第5,804,441号、FERM BP-5165の受託番号で生命工学工業技術研究所に寄託）、HepG2（ATCCより入手可能）、HuH7（Japanese Cancer Research Resources Bank (JCRB)より入手可能）、FLC-1、FLC-2、FLC-3、FLC-5、FLC-6及びFLC-7（これらFLCシリーズの株細胞は、K. Fujise, S. Nagamori, H. Kameda et al., HEPATOLOGY, 8: 1425, 1988；永森静志, 他, HUMAN CELL 1(1):106,115-118,120,123, 1988；永森静志ほか、カレントセラピー 16:158-162,1998；Kawada,M.et al., In Vitro Cell l.Dev.Biol.,34:109-115,1998；及び、蓮村 哲 ほか、人工血液, 5, 33-37, 1997等を参照）等を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。本発明者が、複数種類の肝細胞株について、HCVの増殖性を比較検討したところ、FLC-4細胞中でHCVが最も良く増殖したので、FLC-4細胞を用いることが好ましい。FLC-4細胞中には、HCVのミニジーンRNAを特異的に安定化させ翻訳効率を上昇させる何らかの宿主因子が存在すると考えられる。

肝細胞を供給後、通常5～15日間培養すると、肝細胞が十分に増殖して肝炎ウイルスを感染させるのに好ましい状態となる。肝細胞は、バイオリアクター本体内で約 10^8 細胞/ml以上にまで増殖する。バイオリアクター本体12内の容積が200mlの場合に、肝細胞は総数で約 2.9×10^{10} まで増殖する。

肝細胞を増殖後、肝炎ウイルスを感染させる。本発明の方法により、A型、B型、C型、D型、E型、G型のようないずれの肝炎ウイルスをも増殖させることができ、特にHCVが好ましい。本発明の方法によれば、異なる型や、同じ型の異なる株系の複数のウイルスを同時に増殖させることも可能である。肝炎ウイルスの感染は、例えば慢性肝炎患者の血清を供給培養液中に含めて培養液として供給することにより行うことができる。肝炎ウイルスを含む培養液を、バイオリアクター本体内の肝細胞に直接添加することにより感染の可能性をより高めることができる。供給する肝炎患者血清の量としては、特に限定されないが、バイオリアクター本体の容積の $1/50 \sim 1/10$ 程度が適当である。あるいは、肝炎ウ

ウイルスを肝細胞内で構築することができる、肝炎ウイルスの感染性 cDNA クローンを注入することもできる。従って、本発明において「肝炎ウイルスを感染させる」ことには、完全な肝炎ウイルス粒子を感染させることのみならず、肝細胞内で肝炎ウイルスを構築できる核酸を発現する、感染性を有する組換えベクターを感染させることも包含される。なお、肝炎ウイルス含有培養液を供給した後、好ましくは 2 時間～24 時間程度、さらに好ましくは 2～10 時間程度は、新たな培養液の供給及び培養液の循環を停止し、さらにその後好ましくは 2 時間～48 時間程度、さらに好ましくは 6～48 時間程度は新たな培養液の供給を行わずにバイオリアクター本体 12 の頂部から排出された培養液を再度バイオリアクター本体 12 に培養液として供給することが好ましい。このようにすることにより肝炎ウイルスが感染する可能性を高めることができる。また、肝炎ウイルスを感染させる直前 15 分間～4 時間程度、さらに好ましくは 30 分間～2 時間程度、それまでの新鮮培地供給速度及び酸素供給速度を 1.5 倍～4 倍程度、さらに好ましくは 1.5 倍～2.5 倍程度に増加させて培養することが好ましい。このようにすることにより肝炎ウイルスが感染する可能性を高め、かつ細胞の状態を良好に保つことができる。また、肝細胞の培養開始後、酸素消費量がバイオリアクター本体の容積の半分の $\text{ppm} \pm 30\%$ （例えば、バイオリアクター本体内の容積が 30 ml の場合には $15 \text{ ppm} \pm 30\%$ ）程度になった時点で培養温度を徐々に下げ、酸素消費量が安定した後上記のようにウイルスを感染させることがウイルス感染の確率を高める上で好ましい。この際、培養温度は $28^{\circ}\text{C} \sim 34^{\circ}\text{C}$ が好ましく、さらに好ましくは $29^{\circ}\text{C} \sim 32^{\circ}\text{C}$ 程度である。また、ウイルス感染後の培養も、このような低温下で行うことが、ウイルス感染を持続し、細胞の状態を良好に保つ上で好ましい。

上記の肝炎ウイルス感染処理後、上記した条件で肝細胞の培養を続けることにより、肝炎ウイルスが肝細胞内で増殖し、感染後 2～3 週間程度で培養液排出管 20 から排出される培養液中に肝炎ウイルスが含まれるようになる。従って、排出される培養液から肝炎ウイルスを回収することにより肝炎ウイルスを分離することができる。培養液からの肝炎ウイルスの分離は、限外ろ過膜を用いたろ過や、遠心分離、ゲルろ過クロマトグラフィー等の常法により行うことができる。

本発明の方法は、肝細胞などの接着性の低い細胞であっても、これを生体内に存在すると同様な３次元的に展開し、長期にかつ大量に培養できることを開示するものである。したがって、本発明は、接着性の低い細胞を３次元的に長期にかつ大量に培養する方法を提供するものである。

また、本発明の方法は前記してきたHCVに限らず、HBVやHEVなどの肝炎ウイルス、肝細胞でのデング熱ウイルスなどにも適用することができる。

本発明の方法により増殖されたウイルスは、ワクチンの開発や、抗肝炎ウイルス抗体を誘導するための免疫原として利用することができる。また、上記した培養肝細胞中での肝炎ウイルスの増殖系は、肝炎ウイルスの回収のみならず、プロテアーゼ阻害剤やアンチセンスRNA若しくはアンチセンスDNA等の肝炎治療薬の開発に利用することも可能である。

実施例

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

実施例 1

(1) ラジアルフロー型バイオリアクター

第1図に示す構造を有するラジアルフロー型バイオリアクターを準備した。バイオリアクター本体12及び培養液排出管20は、直径約40 μ mの貫通孔を有する多孔性の金属焼結材料から成るものであった。バイオリアクター本体12内の容積は30mlであった。バイオリアクター本体12内に充填した多孔性担体は、多孔性ガラスビーズ（商品名Siran, ドイツ国Schott Glasswerk Co. Ltd.）であった。このガラスビーズの直径は0.6mm、内部は蜂巢状に孔が空いており、空隙率は50%、表面積は90m²/L-matrix、孔径は20～120 μ mであった。このようなガラスビーズをバイオリアクター本体12内に18g充填した。従って、細胞接着面積は1500cm²/g-matrixであった。

(2) 培養システム

前記(1)のラジアルフロー型バイオリアクターを含む培養システムの概要を

第2図に模式的に示す。第2図に示すシステムにおいて、新鮮な培養液は新鮮培養液貯蔵容器24内に蓄えられており、ポンプ26により培養液調整槽28内に移送される。培養液調整槽28には攪拌機30が備えられており、ここで培養液の酸素濃度、二酸化炭素濃度及びpHが調整される。なお、培養液調整槽28を載せている台31には加熱手段が設けられており、培養液の温度を調整することができる。NaOH貯蔵容器32内には1N NaOH溶液が蓄えられており、必要に応じてポンプ34により培養液調整槽28内に移送され、培養液のpHが調整される。一方、酸素ポンプ36及び二酸化炭素ポンプ38が流量コントローラー40を介して培養液調整槽28に接続されている。酸素ポンプ36及び二酸化炭素ポンプ38から、それぞれ酸素及び二酸化炭素が必要量だけ培養液調整槽28に供給される。流量コントローラー40はマイクロコンピューター42に接続されており、該マイクロコンピューターにより、流量が20分に一度の割合でチェックされ、制御される。培養液調整槽28内で酸素濃度、二酸化炭素濃度及びpHが調整された培養液は、ポンプ44によりラジアルフロー型バイオリアクター10に底部から供給される。供給された培養液は、第1図に基づいて説明したように、ラジアルフロー型バイオリアクター10の培養液排出管の頂部から排出される。排出された培養液はポンプ46により排出培養液貯蔵容器48に蓄えられる。なお、第2図に示す培養システムでは、排出された培養液を培地調整槽28に戻す経路も設けられており、排出培養液の全部又は一部を、必要に応じて培養液として再度供給することも可能な構成となっている。なお、図示してはいないが、マイクロコンピューター42は、各ポンプと接続され、また、バイオリアクター本体に供給される培養液を測定する図示しない酸素濃度計及び排出された培養液の酸素濃度を測定する図示しない酸素濃度計とも接続され、さらに培養液調整槽28内に備えられた図示しないpHメーター及び温度計とも接続されており、培養液の酸素濃度、pH、温度、培養液の供給量はマイクロコンピューター42により自動制御される。

(3) 肝細胞の播種及び培養

樹立肝細胞株である上記FLC-4株を 2×10^6 個までフラスコ内で継代培養した。培養液をバイオリアクター本体内に流通させた後、フラスコ内で培養した

F L C - 4 細胞を培養液に加え、バイオリアクター本体内に供給することにより肝細胞の播種を行った。播種後 6 時間は、ポンプ 4 4 及び 4 6 を停止して細胞のバイオリアクター本体内部からの流出を防いだ。その後は、25 ml / 日の流量で新鮮な培養液を供給した。また、培養液の循環速度は 10 ~ 40 L / 日であった。培養液の pH は 7.0、温度は 37℃、酸素濃度は排出培養液中の酸素濃度が 1 ~ 6 ppm となるようにコンピューターにより自動制御した。

培養液は市販の次の組成（単位は全て mg / L）を有するものである。

| | | | |
|---|----------|---|-----------|
| N a C l | 6 0 0 0、 | K C l | 4 0 0、 |
| M g C l ₂ | 1 0 0、 | M g S O ₄ | 9 8、 |
| N a H ₂ P O ₄ | 1 2 5、 | F e S O ₄ - 7 H ₂ O | 0. 8、 |
| Z n S O ₄ - 7 H ₂ O | 0. 0 1、 | C u S O ₄ - 5 H ₂ O | 0. 0 0 1、 |
| D - グルコース | 2 0 0 0、 | D - マンノース | 5 0 0、 |
| L - アスパラギン塩酸塩 | 2 0 0、 | D - ガラクトース | 2 0 0、 |
| L - アラニン | 2 0、 | アラニル - L - グルタミン | 5 0 0、 |
| L - アスパラギン酸 | 2 0、 | L - グルタメート | 2 0、 |
| グリシン | 3 0、 | グリシル - L - グルタミン | 5 0 0、 |
| L - イソロイシン | 1 0 5、 | L - リジン | 1 4 6、 |
| L - フェニルアラニン | 6 7、 | L - セリン | 8 0、 |
| L - オルニチン | 1 0 0、 | L - スレオニン | 9 5、 |
| L - トリプトファン | 2 5、 | L - チロシン | 6 4、 |
| L - バリン | 9 4、 | コハク酸 | 1 0 6、 |
| ウリジン | 5、 | コリン二酒石酸 | 2 0、 |
| 葉酸 | 4、 | イノシトール | 2 0、 |
| 塩酸ピリドキサール | 4、 | リボフラビン | 0. 4、 |
| ビルビン酸ナトリウム | 1 1 0、 | グリセロリン酸 | 1 5 0 0、 |
| H E P E S | 1 2 0 0、 | N a H C O ₃ | 1 8 0 0、 |
| ヒトトランスフェリン | 5、 | インシュリン | 5、 |
| フェノールレッド | 5。 | | |

これにウシ胎児血清を 2 % 添加したものをを用いた。培養液中の酸素やグルコース

消費量の増加により、細胞の活動性が確認され、順調に酸素消費量の増大が認められた。なお、ここで、酸素消費量は、バイオリアクター本体 12 に供給される培養液中の酸素濃度と、バイオリアクター本体 12 の頂部から排出される培養液中の酸素濃度との差から求めた。また、グルコース消費量は、排出された培養液中のグルコース濃度を市販のグルコース濃度測定キットを用いて測定し、この濃度と供給培養液中のグルコース濃度との差から求めた。

(4) HCV の感染

リアクターによる培養開始 7 日目に酸素消費量が 15 ppm に達し、この時点で培養温度を徐々に 32℃ に下げた。細胞の酸素消費量が安定した培養開始 9 日目に HCV の感染を行った。HCV の感染を行う前に培養液供給量及び酸素供給量を 2 倍に増加させて 1 時間培養した。その後、HCV の感染を行った。HCV の感染は、慢性 C 型肝炎患者の血清（チンパンジーに対する感染価が 5.5 CID₅₀/ml）1 ml を 10 ml の培養液に溶解したものを培養液として、バイオリアクター本体頂部直後の培養液循環チューブから分枝し、バイオリアクター本体内部に連通する図示しない管からバイオリアクター本体内部に供給することにより行った。その後 6 時間にわたりポンプを停止した。次いで、循環ポンプ 44 を起動させたが、バイオリアクター 10 の頂部から排出された培養液の全量を培養液調製槽 28 に戻し、新たな培地の供給を行うことなく 24 時間培養した。その後、上記と同様にして（ただし、培養温度は 29～32℃）培養を継続した。

(5) 排出培養液中の HCV の検出

HCV 感染処理後、上記した通常の条件で培養を再開してから毎日排出培養液中の HCV を常法である RT-PCR により検出した。

ここで、逆転写に用いたプライマーの塩基配列は、

AACACTACTCGGCTAGCAGT であり、

また、PCR に用いたプライマーの塩基配列は、第 1 回目が

CTGTGAGGAAC TACTGTCTT、及び

AACACTACTCGGCTAGCAGT であり、

第 2 回目が、

TTCAACGCAGAAAGCGTCTAG、及び

G T T G A T C C A A G A A A G G A C C C であつた。

また、PCRは、全量を50 μ lとし、変性工程を94℃、45秒間、アニーリング工程を55℃、45秒間、伸長工程を70℃、60秒間として35サイクル行つた。

その結果、感染処理後1～2日は、HCVが検出されたが、その後検出されなくなり、16日目から再度検出されるようになり、感染後19日目に10⁴～10⁵コピー/mlと最大となつた。

HCV RNAは、感染後100日間に至るまでずっと検出された。感染処理後1～2日にHCVが検出されたのは、添加したHCVが流出してきたものが検出されたと考えられる。感染処理後3日目から検出されなくなったのは、添加したHCVの流出が終了したものと考えられる。そして、16日目以降に再度検出されるようになったのは、肝細胞に感染したHCVが肝細胞中で増殖し、この増殖したHCVが培養液中に放出されたものと考えられる。

(6) HCVの塩基配列

感染後23日目に検出されたウイルスのHVR(超可変領域、hyper variable region)の塩基配列を調べたところ(次の表1参照)、バイオリアクターで95%と大部分を占めたクローンはもともと患者血清中で55～60%とメジャーなクローンA1と同一であつた。

結果を表1に、輸血例及びチンパンジーの例と比較できるようにして示す。表1中の「RFB(Radial Flow Bioreactor)」が前記実験の結果を示している。なお、配列はアミノ酸の1文字表記の配列で示されている。

表1中の「クローン数」は、ドナー、チンパンジー、及びレシピエントの血清から回収もの、及びRADから回収されたクローン数を示す。血液提供者及びチンパンジーの血清から回収されたクローン数はアイザキらのデータによつてゐる。

表1中の「W」は輸血後の週数を示し、「D」は感染後の日数を示す。表1中のアミノ酸配列の上の数字は、HCVのタンパク質におけるアミノ酸の位置を示し、ハイフンは最上段に記載されているアミノ酸と同じであることを示す。

表 1 超可変領域 (HVR) の配列とそのクローン数

| 種類 | HVR の配列 | クローン数 | | | | | | | | | |
|-----|--|-------|-----|--------|----|--------|----|-----|-----|--|--|
| | | ドナー | | チンパンジー | | レシビエント | | RFB | | | |
| | | Ex1 | Ex2 | #1 | #2 | #3 | 4W | 5W | 23D | | |
| 384 | | 18 | 11 | 1 | 20 | 20 | 2 | 1 | 19 | | |
| A1 | HYRVTRGVQGHVSTLTS ⁴¹⁰⁸ SLFRPGASQK | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| A2 | S----- | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| A3 | -----L---- | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | | |
| A4 | -----F---- | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| B1 | N-H----- | 5 | 3 | 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| B2 | N-H--A--GAFG--Q---- | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | | |
| B3 | D-H--A--GAFG--Q---- | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| B4 | D-H--A--GAF--TL---- | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | | |
| B5 | N-H--A--GAF--TS---- | 2 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| B6 | D-H--A--GAF--TS---- | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | | |
| B7 | D-H--A--GAFQ--TS---- | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | | |
| B8 | D-H--A--GAFQ--TS--R | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | | |
| B9 | D-H--A--GAPH--TS---- | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 8 | 0 | | |
| B10 | D-H--A--C-GAFH--TS---- | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | | |
| C1 | --H--A--RSV-K--AF-T--P---- | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| C2 | N-H--A--R-A-K--F-T--P---- | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | | |
| D1 | --H-----FK-S---- | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | | |
| | | 30 | 20 | 20 | 20 | 20 | 10 | 10 | 20 | | |

実施例 2

実施例 1 と条件を変えて同様な実験を行った。

(1) 血清添加培養液での培養系

バイオリアクターは実施例 1 と同じものを用いた。フラスコにて培養した 1×10^6 個の FLC 4 細胞を培地制御槽に播種した。2% 血清添加培地（培養液）50 ml / 日を用いて培養したところ、バイオリアクター内の FLC 4 細胞の酸素消費量は徐々に増加を始め、30 日目には 25 ppm に（第 3 図（A）参照）、105 日目には 35 ppm に達した。経過中、バイオリアクター後方の溶存酸素濃度が 1.0 ppm 未満にならないように、培養温度を 37℃ より徐々に低下させ（第 3 図（A）参照）、105 日目には 30℃ まで下げた。培養液中のアルブミン量は、低温培養でも経過中 75 μ g / ml 以上であり、細胞の活動性は維持されていた。

培養における、温度（℃）、酸素濃度（ppm）及びアルブミン濃度（ μ g / ml）の推移を第 3 図（A）に示す。第 3 図（A）の白丸印（○）は温度（℃）を示し、黒丸印（●）は酸素濃度（ppm）を示し、白四角印（□）はアルブミン濃度（ μ g / ml）を示す。温度（℃）、及び酸素濃度（ppm）は左側の目盛りで示され、アルブミン濃度（ μ g / ml）は右側の目盛りで示されている。横軸は日数を示している。数値は第 3 図（C）に示されているとおりである。

前記した実施例 1（5）と同様の方法により、排出培養液中の HCV の検出を行った。

その結果を第 3 図（B）に示す。第 3 図（B）の白丸印（○）は RNA 力価（titer）を示し、白四角印（□）は HCV-コア蛋白質が陰性であることを示し、黒四角印（■）は HCV-コア蛋白質が陽性であることを示す。第 3 図（B）の縦軸は RNA 力価（log₁₀ コピー数 / ml）であり、横軸は培養日数である。

第 3 図（C）は、培養液中の GPT（IU / l）、GOT（IU / l）、及び LDH（IU / l）の推移を示す。第 3 図（C）の黒丸印（●）は GPT（IU / l）を示し、白丸印（○）は GOT（IU / l）を示し、白四角印（□）は LDH（IU / l）を示す。GPT（IU / l）、及び GOT（IU / l）は左側の目盛りで示され、LDH（IU / l）は右側の目盛りで示されている。横軸

は日数を示している。

(2) 無血清培養液での培養系

無血清培地（培養液）50 ml / 日を用いてFLC4細胞をバイオリアクターで培養した。

結果を第4図及び第5図に示す。第5図は、タイプ1aの感染性クローンRNAをバイオリアクターにトランスフェクションした場合（下記の（4）参照）のものである。

培養における、温度（℃）、酸素濃度（ppm）及びアルブミン濃度（ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）の推移を第4図（A）及び第5図（A）に示す。但し、第4図（A）にはアルブミン濃度（ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）は示されていない。第4図（A）及び第5図

（A）の白丸印（○）は温度（℃）を示し、黒丸印（●）は酸素濃度（ppm）を示し、第5図（A）の白四角印（□）はアルブミン濃度（ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を示す。温度（℃）、及び酸素濃度（ppm）は左側の目盛りで示され、アルブミン濃度（ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）は右側の目盛りで示されている。横軸は日数を示している。数値は第4図（C）又は第5図（C）に示されているとおりである。

前記した実施例1（5）と同様の方法により、各排出培養液中のHCVの検出を行った。

その結果を第4図（B）及び第5図（B）に示す。第4図（B）及び第5図（B）の白丸印（○）はRNA力価（titer）を示し、白四角印（□）はHCV-コア蛋白質が陰性であることを示し、黒四角印（■）はHCV-コア蛋白質が陽性であることを示す。第4図（B）及び第5図（B）の縦軸はRNA力価（ \log_{10} コピー数/ml）であり、横軸は培養日数である。

第4図（C）及び第5図（C）は、培養液中のGPT（IU/l）、GOT（IU/l）、及びLDH（IU/l）の推移を示す。第4図（C）及び第5図（C）の黒丸印（●）はGPT（IU/l）を示し、白丸印（○）はGOT（IU/l）を示し、白四角印（□）はLDH（IU/l）を示す。GPT（IU/l）、及びGOT（IU/l）は左側の目盛りで示され、LDH（IU/l）は右側の目盛りで示されている。横軸は日数を示している。

この培養系においては、培養温度は培養開始5日目に35℃に下げて培養し、

100日以上 of 長期にわたり継代することなしに培養することができた（第5図（A）参照）。その間、細胞の酸素消費量は15～20 ppmで安定していた（第5図（A）参照）。

以上のように、ラジアルフロー型バイオリアクターを用いて30～35℃の低温で培養することで、無血清培地または2%血清添加培地で、肝細胞癌由来細胞株を100日以上 of 長期にわたり、継代することなしに培養することができ、その間、酸素消費量、グルコース消費量、アルブミン量等で示される肝細胞の活動性は保たれていた。

（3） 慢性肝炎患者血清による感染実験

実施例1の（4）と同様にして慢性肝炎患者血清を感染させ、実施例1（5）と同様にして排出培養液中のHCVを検出した。その結果、感染後3日目にウイルスRNAは一度陰性になったが、その後再び陽性化し、感染後10日目に $10^3 \sim 10^4$ コピー/mlと最大となった（第4図（B）参照）。

このように、実施例1の場合と同様、接種後一度HCV RNAは陰性になってから再び陽性化し増えてくることから、ウイルスが感染増殖しているものと考えられた。なお、実施例1及び2のいずれの感染実験でも、経過中GOT、GPT、LDH等肝障害の指標の上昇は認められなかった（第4図（C）及び第5図（C）参照）。

（4） 感染性クローンによるトランスフェクション実験

タイプ1aの感染性クローンRNAをバイオリアクターにトランスフェクションしたところ（第5図参照）、ウイルスRNAはトランスフェクション直後から徐々に減少し、44日目には 10^2 コピー/ml未満にまでなったものの、その後57日目に再び 10^4 コピー/mlまで増加し（第5図（B）参照）、100日目まで約 $10^3 \sim 10^4$ コピー/mlと持続していた。なお、トランスフェクションは、感染性クローンH77（Yanagi et al., 1998, Proc Natl Acad Sci U S A. Aug 5;94(16):8738-43）の10 μ gを、リボフェクチン法により、上記した患者血清の場合と同様に、一時的に循環を止めてトランスフェクションした。なお、リボフェクチン法によるトランスフェクションは具体的には次のように行った。

前述のH77よりインビトロでRNAを合成した10 μ gをOptiMEM1

ml にリポフェクチン 150 μ l とともに混合し 15 分間室温に放置した。その後、リアクター内を Opti MEM で十分満たした後、RNA を注入した。

また、培養上清中のコア蛋白も徐々に増加し、44 日目に最大になった（第 5 図（B）参照）。コア蛋白は、免疫測定により定量した。より具体的に記載すると、沈殿試薬により培養液中のウイルス粒子を沈殿分画として収集後、それを分散試薬に分散させる。抗体試薬、および中和試薬で処理した後、HCV コア蛋白がチューブ上の抗 HCV コア蛋白モノクローナル抗体に結合して、複合体を形成する。未反応物質を洗浄除去した後、ペルオキシダーゼ標識抗 HCV コア蛋白モノクローナル抗体を加えると、前述のチューブ上の複合体に結合する。未反応物質を洗浄除去した後、HPPA 気質液を添加するとチューブ上に結合したペルオキシダーゼ酵素により蛍光物質が生成され、これを 323 nm の励起光を照射し、生じた蛍光を 410 nm で測定する。これをあらかじめ標準液より作製された検量線から濃度を算定する。

さらに、コア蛋白の存在を確認するために、トランスフェクション後 96 日目の培養液を 200 倍に濃縮し、10～60% (W/W) 蔗糖勾配法にて分画して、それぞれの分画の HCV RNA と HCV のコア蛋白を測定した。

結果を第 6 図に示す。第 6 図の下段のグラフの白丸印 (○) は HCV RNA の力価 (\log_{10} コピー数/ml) を示し、黒丸印 (●) は HCV コア蛋白の濃度 (pg/ml) を示し、第 6 図の上段のグラフの黒四角印 (■) はコア蛋白の密度 (g/ml) を示す。

この結果、密度勾配が約 1.07 及び 1.18 g/ml の 2 箇所でもコア蛋白の極大が測定され、コア蛋白が 2 峰性の曲線であることがわかった。このことは、培養液中にウイルス粒子が存在していることを示すものである。

また、トランスフェクション後 8、44 日目の培養液を RNase 処理した後に nest-RT PCR で HCV の RNA が検出できたことから、ウイルス粒子内に保護された HCV RNA の存在が示唆された（第 7 図参照）。なお、この nest-RT PCR で用いたプライマーの塩基配列は、フォワード側が CTGTGAGGAACTACTGTCTT, AACACTACTCGGCTAGCAGT, リバーズ側が TTCACGCAGAAAGCGTCTAG, GTGA

T C C A A G A A A G G A C C Cであった。

結果を第7図として示す。第7図は左側から、培養前日（-1日）の培養液、培養8日目の培養液、培養44日目の培養液、対照としての血清、対照としてのRNAであり、各々、RNase処理無し（RNase-）でnest-RT PCR無し（RT-）、RNase処理無し（RNase-）でnest-RT PCR有り（RT+）、及びRNase処理有り（RNase+）でnest-RT PCR有り（RT+）の3つのレーンで構成されている。第7図の上段の数字は培養日数を示し、+-の表示の上の段はnest-RT PCR処理の有無を有り（+）、無し（-）で示し、下の段はRNase処理の有無を有り（+）、無し（-）で示している。第7図の縦方向の数値は塩基数（mer）を示す。

さらに、トランスフェクション後110日目の細胞内にタグを用いたRT PCR法でマイナス鎖RNAを検出できたことから、細胞内にウイルス複製中間体の存在が示唆された（第8図参照）。このRT PCRは、具体的には次のように行った。このRT PCRで用いたプライマーの塩基配列は、逆転写反応に、T C T T G G T G G C G A A T A A G C C A T G G C G T T A G T A T、PCR反応にフォワード側が、T C A T G G T G G C G A A T A A、リバーズ側が、C G C G G C A A C A A G T A A Aであった。

結果を第8図に示す。第8図のMはマーカーを示し、レーン1のNは細胞（-）で、ネガティブストランドRNA（negative strand RNA）及びポジティブストランドRNA（positive strand RNA）も存在していないコントロールを示し、レーン2の（-）RNAはネガティブストランドRNA（negative strand RNA）を加えた場合を、レーン3の（+）RNAはポジティブストランドRNA（positive strand RNA）を加えた場合をそれぞれ示し、レーン4の細胞（Cell）はRFBで培養したHCV感染細胞の場合を示す。第8図の縦方向の数値は分子量を示す。この結果、培養された感染細胞中にネガティブストランドRNA（negative strand RNA）の存在が認められた。

培養経過中のHVRの塩基配列をもとの感染性クローンと比較したところ、25、71、106日目にそれぞれ1、2、2個の塩基の変異が認められたが、この培養経過を通して特定の塩基配列をへの収束、変異の蓄積などは認められなかった。結果を次の表2に示す。結果は、表2中の「RFB (Radial Flow Bioreactor)」の欄に示されている。なお、配列はアミノ酸の1文字表記の配列で示されている。

表2中の「クローン数」は、培養液中から回収されたクローン数を示す。

表2中の「D」は感染後の日数を示す。

表2中のアミノ酸配列の上の数字は、HCVのタンパク質におけるアミノ酸の位置を示し、ハイフンは最上段に記載されているアミノ酸と同じであることを示す。

表2 超可変領域 (HVR) の配列と培養液から回収されたクローン数

| HVRの配列 | クローン数 | | |
|--|-------|-----|------|
| | RFB | | |
| | 25D | 71D | 106D |
| ³⁸⁴ ETHVTTGGNAGRTTAGLVGLLTPGAKQ ⁴¹⁰ ⁶ | 19 | 18 | 18 |
|E.. | 1 | 0 | 0 |
|I..... | 0 | 1 | 0 |
|D..... | 0 | 1 | 0 |
|R.. | 0 | 0 | 1 |
|T... | 0 | 0 | 1 |
| | 20 | 20 | 20 |

以上のように、タイプ1aの感染性クローンをバイオリアクターにトランスフェクションしたところ、1) ウイルスRNAの再増加、2) コア蛋白質の増加、

3) 粒子内ウイルスRNAの存在、4) 細胞内ウイルス複製中間体の存在、5) 塩基配列の変異、の5通りの方法でHCVの複製を確認することに成功した。ウイルス増殖に伴う肝障害については、経過中明らかなGOT、GPT、LDHの上昇などは認められなかった(第5図(C)参照)。

産業上の利用可能性

本発明は、生体外では培養が困難であるとされていた肝炎ウイルスの生体外での培養、増殖方法を初めて提供するものであり、肝炎ウイルスの研究のみならず、肝炎ウイルス感染症の治療、予防、及び機構を研究開発するための材料を提供するものである。より具体的には、ウイルス性肝炎の治療薬の研究開発に必須とされているウイルスを簡便な方法で提供することができる手段を提供するものである。

さらに、本発明の方法は、ウイルスの増殖の機構及び変異の機構を解明するためのウイルスの増殖方法を提供するものである。

このように本発明は、ウイルスの生態の研究のみならず、ウイルス感染症の治療、予防、処置の方法を研究開発のためのウイルスの必要な量を安定に供給する方法を提供するものである。

請 求 の 範 囲

1. 接着性の低い細胞を担持させ得る担体を収容した培養器の担体周縁に培養液の流れを作り、接着性の低い細胞を当該担体に担持させて増殖させ、培養されている細胞に肝炎ウイルスを感染させて、当該肝炎ウイルスを増殖させることからなる肝炎ウイルスの増殖方法。
2. 担体が、粒子状の多孔性担体である請求の範囲第1項に記載の方法。
3. 接着性の低い細胞が、肝細胞である請求の範囲第1項又は第2項に記載の方法。
4. 接着性の低い細胞が、樹立細胞である請求の範囲第1項ないし第3項のいずれかに記載の方法。
5. 肝炎ウイルスが、H C Vである請求の範囲第5項に記載の方法。
6. 担体周縁の培養液の流れが、培養器の外周から中心部への流れである請求の範囲第1項ないし第5項のいずれか1項に記載の方法。
7. 粒子状の多孔性担体上に肝細胞を担持させたものを収容するバイオリアクター本体の周縁部から中心部に向けて培養液を流通させるラジアルフロー型肝細胞バイオリアクター中に維持された前記肝細胞に肝炎ウイルスを感染させ、引き続きバイオリアクター本体の周縁部から中心部に向けて培養液を流通させて前記肝細胞を培養し、それによって前記感染された肝炎ウイルスを前記肝細胞中で増殖させることを含む、肝炎ウイルスの増殖方法。
8. 前記肝細胞は樹立細胞株である請求の範囲第7項記載の方法。
9. 前記樹立細胞株はF L C - 4 株 (F E R M B P - 5 1 6 5) である請求の範囲第8項記載の方法。
10. 肝炎ウイルスの感染は、前記培養液中に肝炎ウイルスを添加することにより行われ、肝炎ウイルスを培養液に添加後、新鮮な培地を供給せずに、使用した培地を循環させ、次いで、培養液の流通を停止し、次いで、新鮮な培地を供給せずに、使用した培地を循環させて培養する工程を含む請求の範囲第7項ないし第9項のいずれか1項に記載の方法。
11. 肝炎ウイルスを培養液に添加する前に、新鮮な培地の供給速度及び酸素供

給速度をそれまでの速度よりも大きくする請求の範囲第7項ないし第10項のいずれか1項に記載の方法。

12. 前記肝炎ウイルスはC型肝炎ウイルスである請求の範囲第7項ないし第11項のいずれか1項に記載の方法。
13. 周縁部から中心部に向けて培養液を流通させることができるバイオリアクター本体と、該バイオリアクター本体の周縁部に培養液を供給する培養液供給路と、該バイオリアクター本体の内部に收容され、その上に肝細胞が担持される粒子状の多孔性担体と、該バイオリアクター本体の内部に位置し、培養液をバイオリアクター本体から排出する培養液排出路とを具備したラジアルフロー型肝細胞バイオリアクターから成る肝炎ウイルスの増殖装置。
14. C型肝炎ウイルスの増殖装置である請求の範囲第13項記載の増殖装置。
15. 接着性の低い細胞を担持させ得る担体を收容した培養器の担体周縁に培養液の流れを作り、接着性の低い細胞を当該担体に担持させて増殖させることからなる、接着性の低い細胞を増殖する方法。
16. 増殖が3次元的な増殖である請求の範囲第15項に記載の方法。
17. 接着性の低い細胞が、肝細胞である請求の範囲第15項又は第16項に記載の方法。
18. 接着性の低い細胞が、樹立細胞である請求の範囲第15項ないし第17項のいずれか1項に記載の方法。
19. 肝炎ウイルスが、HCVである請求の範囲第15項ないし第17項のいずれか1項に記載の方法。
20. 担体周縁の培養液の流れが、培養器の外周から中心部への流れである請求の範囲第15項ないし第19項のいずれか1項に記載の方法。